HVJ Envelope siRNA/miRNA導入キット（研究用）

GenomONE-Si

浮遊系免疫細胞へのsiRNA/miRNA導入

データ集

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

1310GS2

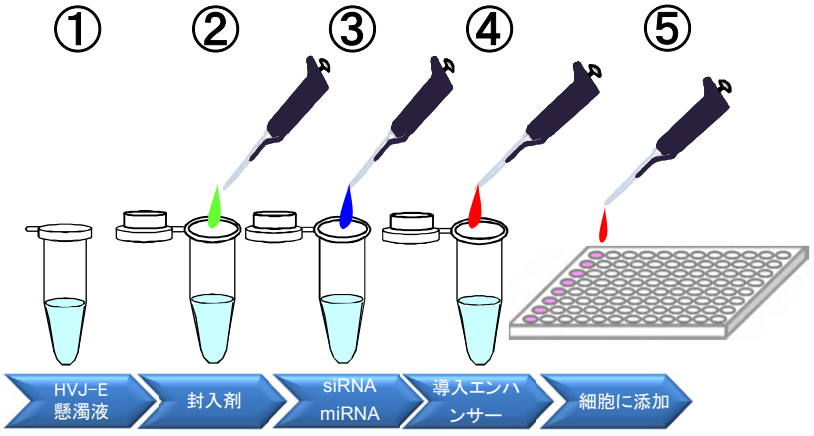
HVJ Envelope siRNA/miRNA導入キット

GenomONE - Si

＜特長＞
- □ 合成オリゴ型のsiRNA/miRNAの導入に最適
- □ 簡便な操作性（5～10分で導入が完了）
- □ 導入困難な浮遊系免疫細胞にも適用可能
- □ 多検体の迅速スクリーニング(HTS)に最適
- □ 低細胞毒性と高い安全性

GenomONE-Siは、HVJ Envelope（HVJ-E:不活化センダイウイルス）を用いたsiRNA/miRNA専用のトランスフェクションキットで、初代培養免疫細胞にも高効率な導入が可能です。

基本プロトコル



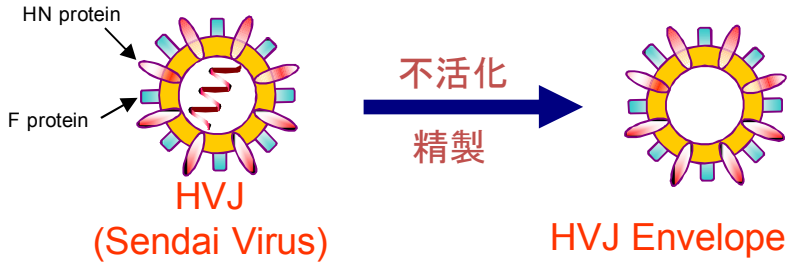
①～④の操作は、必ず氷上で行ってください。
- 基本プロトコルは、5ステップで完了。（インキュベーションの必要もありません。）
- High Throuhput Screening(HTS)用のプロトコルもご用意

製品仕様

製品コード	凍結乾燥 HVJ-E（本）	使用回数assays (wells)			税別価格（円）	税込価格（消費税8%）（円）
		6-well plate	24-well plate	96-well plate		
GS001	1	100	400	2,000	28,000	30,240
GS004	4	400	1,600	8,000	75,000	81,000
GS016	16	1,600	6,400	32,000	280,000	302,400
GS040	40	4,000	16,000	80,000	650,000	702,000

GenomONE-Si (HVJ-E siRNA/miRNA transfection kit)

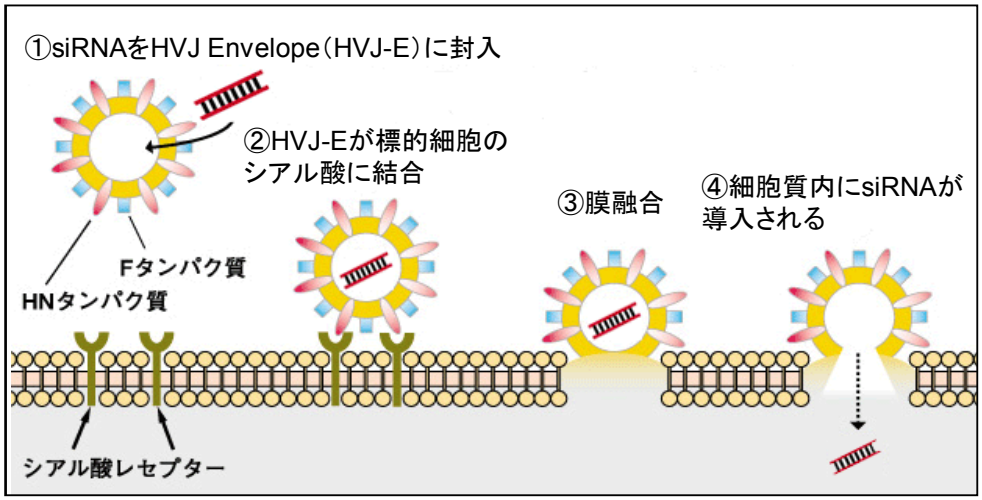
HVJ-E（不活化センダイウイルス）とは？



Hemagglutinating virus of Japan（HVJ）Envelope（HVJ-E）は，センダイウイルスのゲノムRNAを完全に不活化した後，精製した平均直径が約300nmの非増殖性・非感染性vesicleです．
HVJ-Eの外膜（エンベロープ）に分布するF proteinは，liveウイルスと同レベルの強い膜融合活性を保持していることから，HVJ-Eそのものを細胞間融合剤として用いたり，HVJ-Eに遺伝子，タンパク質，siRNA，miRNAなどを封入して細胞内に導入し，その機能 を解析する研究に応用することが可能です．

HVJ(Hemagglutinating virus of Japan）は，Sendai virus(SeV)または Mouse Parainfluenza virus type 1とも呼ばれます

HVJ-Eの膜融合能を利用した細胞への導入



GenomONE-Si のsiRNA導入原理

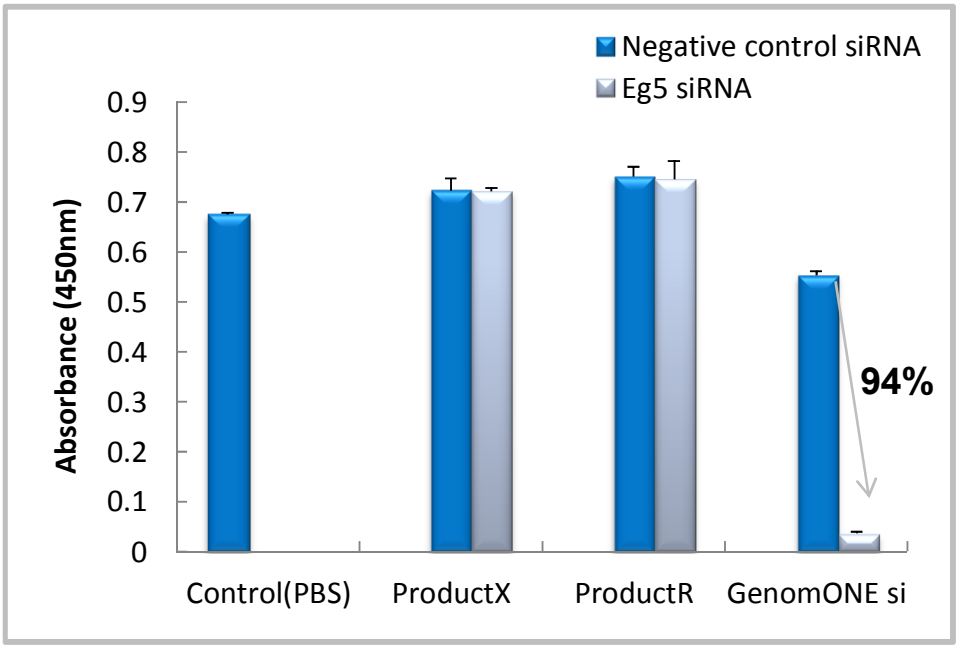
References (Review articles)

Kaneda Y. *et al.* : Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. ***Molecular Therapy***, 6, 219-226 (2002).
Kaneda Y. : New vector innovation for drug delivery: development of fusigenic non-viral particles. ***Curr. Drug Targets***, 4(8), 599-602 (2003).
Kaneda Y. : Applications of Hemagglutinating Virus of Japan in therapeutic delivery systems. ***Expert Opin. Drug Deliv***., 5(2),221-233 (2008).
Zhang Q. *et al.* : HVJ envelope vector, a versatile delivery system: its development, application and perspectives. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, 373, 345-349 (2008).
Kato F. *et al.* : Hemagglutinating Virus of Japan Envelope Vectors as High-Performance Vehicles for Delivery of Small RNAs. ***J. Genet. Syndr. Gene Ther.***, in press (2013).

細胞株（U937，Raji, THP-1, Jurkat, HL-60）へのsiRNA導入

U937

siRNA transfection



U937へのEg5 siRNAの導入

Eg5 siRNA(50nM) transfection → 2days → WST-8（細胞数測定, A_{450}）

GenomONE-Si **の取扱説明書プロトコル（1）で実施**

【Cell】: U-937(Human leukemic monocytic lymphoma cell line, ATCC：CRL-1593.2)
【Culture condition】: 4×10^3cells/well/100μL, 10%FBS-RPMI-1640
【Culture plate】: 96-well plate(IWAKI 3860-096)
【siRNA】: Silencer KIF11(Eg5) siRNA(Ambion Code No.AM4639)
Negative control #1 siRNA(Ambion Code No.AM4639)

Step	手　順	試薬量（96-well plate）
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合（タッピング）	試薬D: 0.5μL
③	siRNA溶液を添加・混合（タッピング）　（10μM）	siRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合（タッピング）	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 0.9μL/well

①～④の操作は、氷上で実施

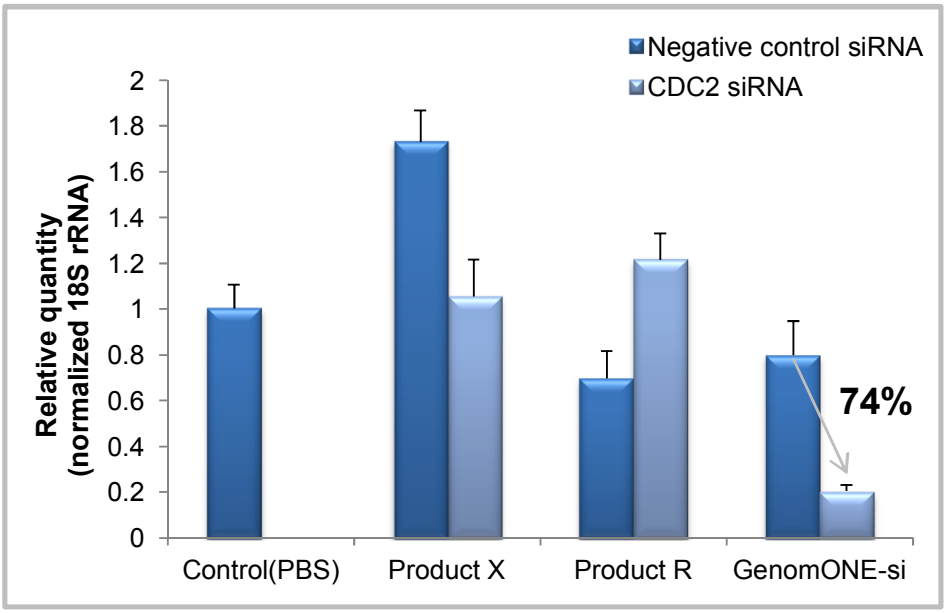
GenomONE-Siを用いてU937にEg5 siRNAを導入したところ、94%のノックダウン効果が得られた。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず、***GenomONE-Si***の優位性が示された。

Eg5(KIF 11)はキネシン様モータータンパク質として、細胞分裂する際の紡錘体微小管を形成するために必須であり、その機能が阻害されると細胞分裂の停止とアポトーシスが誘導される。その現象を利用してsiRNAの導入効果をWST-8法（生細胞数測定法）にて定量的に評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

Raji

siRNA transfection



Relative Quantity; qRT-PCR assays (n=3)

RajiへのCDC2 siRNAの導入

CDC2 siRNA(50nM) transfection → 2days → RT-PCR(mRNA定量)

GenomONE-Si **の取扱説明書プロトコル(1)で実施**

【Cell】: Raji(Human Burkitt lymphoma cell line, ATCC:CCL-86)
【Culture condition】: 1.25×10^5cells/well/500μL, 10%FBS-RPMI-1640
【Culture plate】: 24-well plate(FALCON 3047)
【siRNA】: Very High Potency Hs_CDC2 siRNA (QIAGEN Cat. No. 1027273)
Negative control #1 siRNA(Ambion Code No.AM4639)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	siRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(10μM)	siRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

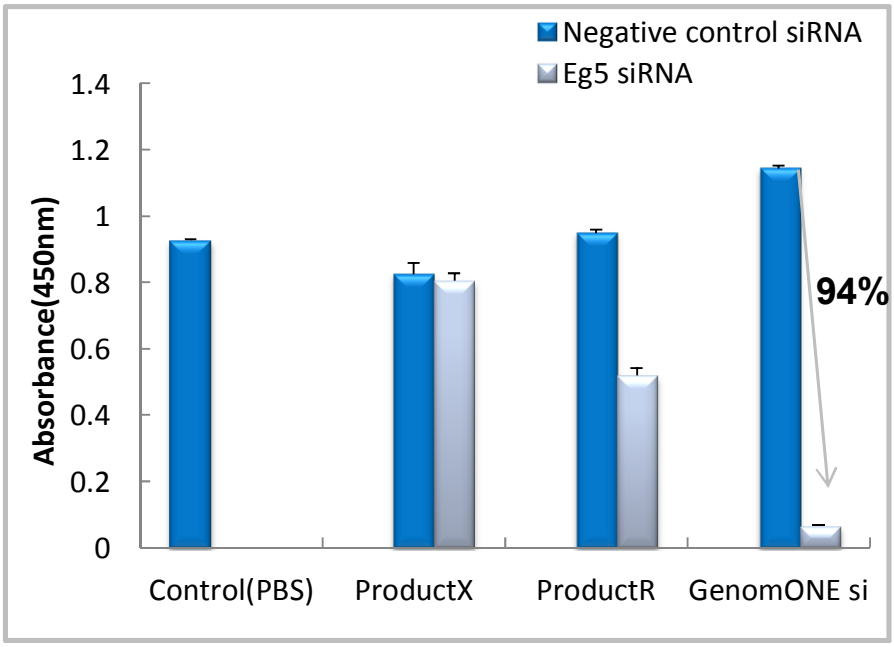
GenomONE-Siを用いてRajiにCDC2 siRNAを導入したところ、75%のノックダウン効果が得られた。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず、***GenomONE-Si***の優位性が示された。

CDC2は、サイクリンBと複合体を形成し、細胞周期 M期を制御するが、そのノックダウン効果をReal-Time PCR法で定量的に評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

THP-1

siRNA transfection



THP-1へのEg5 siRNAの導入

Eg5 siRNA(50nM) transfection → 2days → WST-8（細胞数測定, A_{450}）

GenomONE-Si **の取扱説明書プロトコル（1）で実施**

【Cell】: THP-1(Human acute monocytic leukemia cell line, ATCC:TIB-202)
【Culture condition】: 2.5×10^4cells/well/100μL, 10%FBS-RPMI-1640
【Culture plate】: 96-well plate(IWAKI 3860-096)
【siRNA】: Silencer KIF11(Eg5) siRNA(Ambion Code No.AM4639)
Negative control #1 siRNA(Ambion Code No.AM4639)

Step	手　順	試薬量（96-well plate）
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合（タッピング）	試薬D: 0.5μL
③	siRNA溶液を添加・混合（タッピング）　（10μM）	siRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合（タッピング）	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 0.9μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

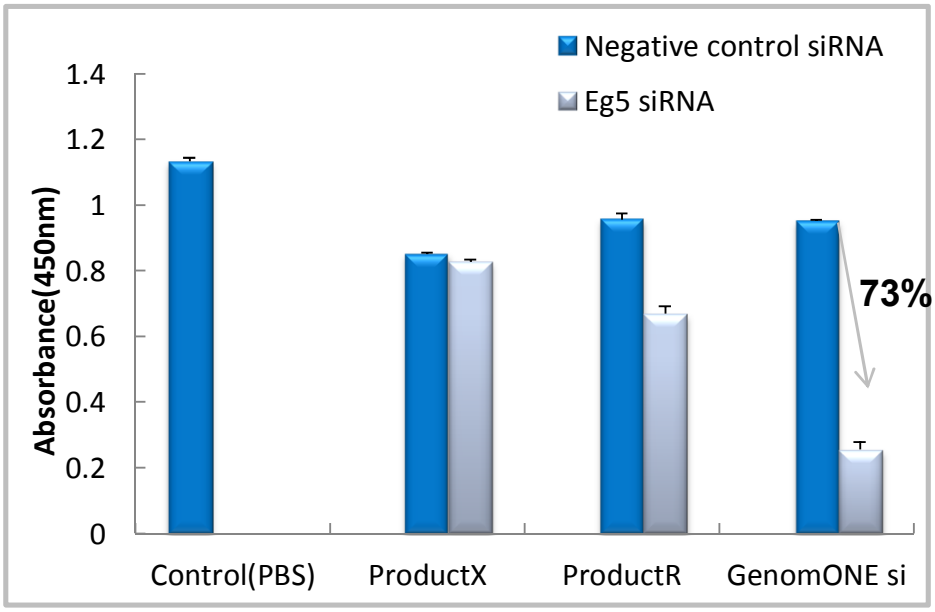
GenomONE-Siを用いてTHP-1にEg5 siRNAを導入したところ、94%のノックダウン効果が得られた。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず、***GenomONE-Si***の優位性が示された。

Eg5(KIF 11)はキネシン様モータータンパク質として、細胞分裂する際の紡錘体微小管を形成するために必須であり、その機能が阻害されると細胞分裂の停止とアポトーシスが誘導される。その現象を利用してsiRNAの導入効果をWST-8法（生細胞数測定法）にて定量的に評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

Jurkat

siRNA transfection



JurkatへのEg5 siRNAの導入

Eg5 siRNA(50nM) transfection → 2days → WST-8（細胞数測定, A_{450}）

GenomONE-Si **の取扱説明書プロトコル（1）で実施**

【Cell】: Jurkat clone E6-1(Human T cell leukemia cell line, ATCC:TIB-152)
【Culture condition】: 2×10^4cells/well/100μL, 10%FBS-RPMI-1640
【Culture plate】: 96-well plate(IWAKI 3860-096)
【siRNA】: Silencer KIF11(Eg5) siRNA(Ambion Code No.AM4639))
Negative control #1 siRNA(Ambion Code No.AM4639)

Step	手　順	試薬量（96-well plate）
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合（タッピング）	試薬D: 0.5μL
③	siRNA溶液を添加・混合（タッピング）　（10μM）	siRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合（タッピング）	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 0.9μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

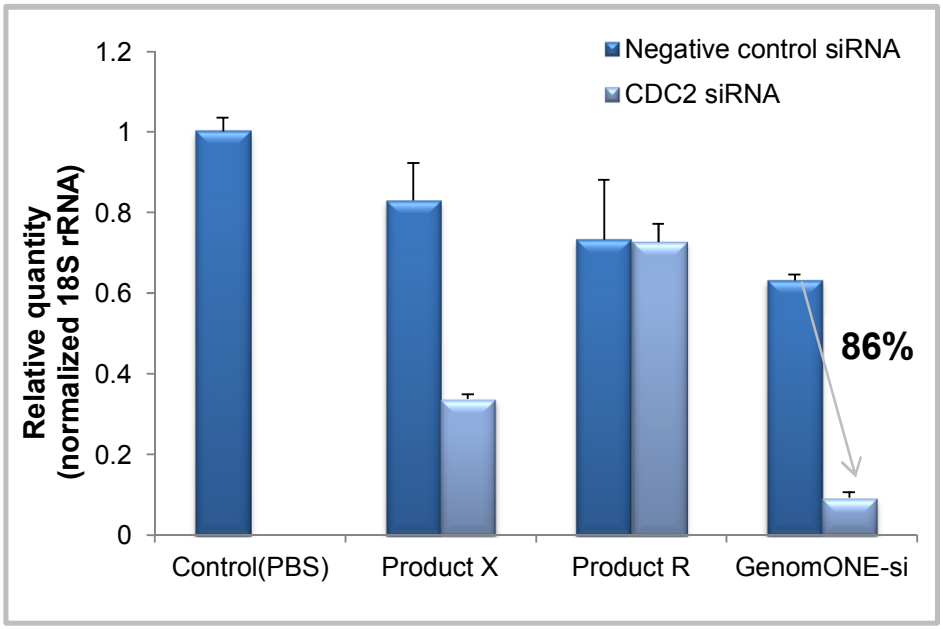
GenomONE-Siを用いてJurkatにEg5 siRNAを導入したところ、73%のノックダウン効果が得られた。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず、***GenomONE-Si***の優位性が示された。

Eg5(KIF 11)はキネシン様モータータンパク質として、細胞分裂する際の紡錘体微小管を形成するために必須であり、その機能が阻害されると細胞分裂の停止とアポトーシスが誘導される。その現象を利用してsiRNAの導入効果をWST-8法（生細胞数測定法）にて定量的に評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

HL-60

siRNA transfection



Relative Quantity; qRT-PCR assays (n=3)

HL-60へのCDC2 siRNAの導入

CDC2 siRNA(50nM) transfection → 2days → RT-PCR(mRNA定量)

GenomONE-Si の取扱説明書プロトコル(1)で実施

【Cell】: HL-60(Human promyelocytic leukemia cell line, ATCC:CCL-240)
【Culture condition】: 1×10^5cells/well/500μL, 20%FBS-RPMI-1640
【Culture plate】: 24-well plate(FALCON 3047)
【siRNA】: Very High Potency Hs_CDC2 siRNA (QIAGEN Cat. No. 1027273)
Negative control #1 siRNA(Ambion Code No.AM4639)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	siRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(10μM)	siRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

GenomONE-Siを用いてHL-60にCDC2 siRNAを導入したところ、85%のノックダウン効果が得られた。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず、**GenomONE-Si**の優位性が示された。

CDC2は、サイクリンBと複合体を形成し、細胞周期 M期を制御するが、そのノックダウン効果をReal-Time PCR法で定量的に評価。

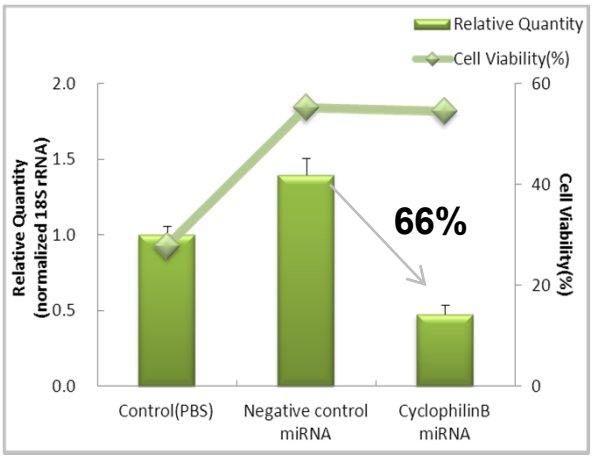
ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

Mouse primary B cells, T cells への siRNA/miRNA導入

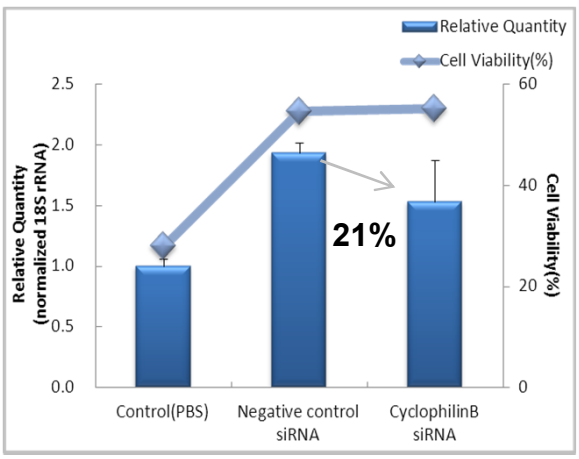
BALB/c mouse primary B cells

siRNA/miRNA transfection

miRNA transfection



siRNA transfection



Relative Quantity; qRT-PCR assays (n=3)
Cell Viability (%); PI staining assay

Mouse primary B cellsへのCyclophilin B siRNA/miRNAの導入

B cells isolation & Transfection → No-stimulation 2 days → RT-PCR (mRNA定量)

GenomONE-Si **の取扱説明書プロトコル(1)で実施**

【Cell】: Mouse primary B cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (6 weeks old)]
【Culture condition】: 5×10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 10mM HEPES, 50μM 2-ME
【Culture plate】: 24-well plate
【siRNA】: siGENOME Cyclophilin B control siRNA (Thermo Scientific Cat No.D-001136-01-05)
Negative control #1 siRNA(Ambion Code No.AM4639)
【miRNA】: Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	siRNA/miRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(10μM)	siRNA/miRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

GenomONE-Siを用いて無刺激のmouse primary B cellsにMimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB) miRNAを導入したところ、66%のノックダウン効果が得られた。一方、Cyclophilin B control siRNAを導入したところ、21%と十分な効果が得られなかった。

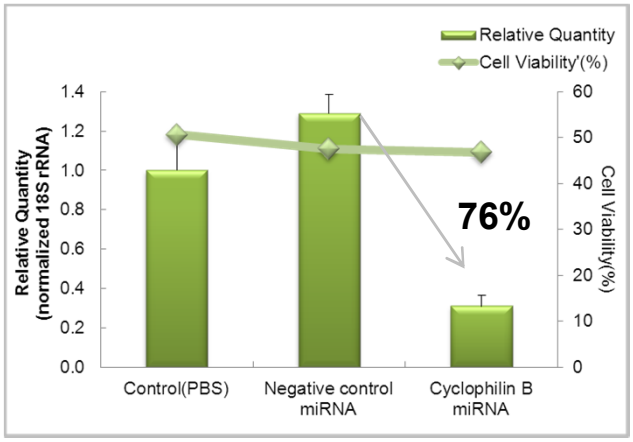
Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の1種で、そのノックダウン効果をReal-Time PCR法で定量的に評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

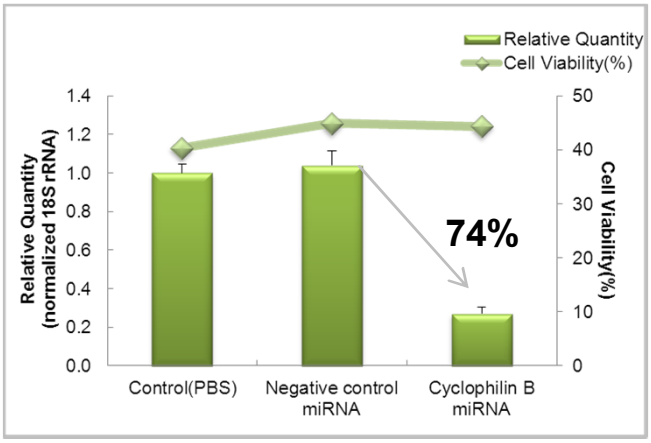
BALB/c mouse primary B cells

miRNA transfection

① Anti-CD40 / LPS stimulation



② Anti-CD40 / IL4 stimulation



Relative Quantity; qRT-PCR assays (n=3)
Cell Viability (%); PI staining assay

Pre-stimulated mouse primary B cellsへのCyclophilin B miRNAの導入

Isolated B cells → Stimulation 1 day → Transfection → No-stimulation 2 days → RT-PCR (mRNA定量)

GenomONE-Si の取扱説明書プロトコル(1)で実施

【Cell】: Mouse primary B cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (7 weeks old)]
【Stimulation】: ① anti-CD40(1μg/mL)/LPS(1μg/mL), ② anti-CD40(1μg/mL)/IL4(34.5ng/mL)
【Culture condition】: 1×10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 10mM HEPES, 50μM 2-ME
【Culture plate】:24-well plate
【miRNA】:Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	siRNA/miRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(2μM)	siRNA/miRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

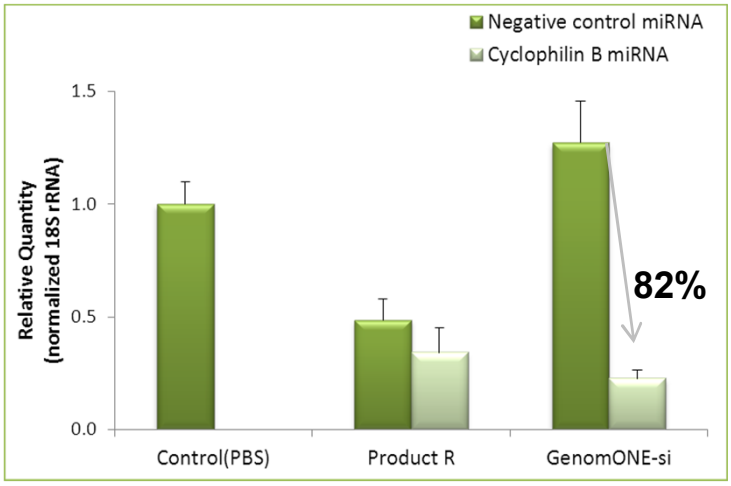
*GenomONE-Si*を用いて① Anti-CD40 / LPS, あるいは、②Anti-CD40 / IL4で刺激したmouse primary B cellsにMimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB) miRNAを導入したところ、いずれも70%以上のノックダウン効果が得られた。

Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の1種で、そのノックダウン効果をReal-Time PCR法で定量的に評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

BALB/c mouse primary B cells

miRNA transfection



Relative Quantity; qRT-PCR assays (n=3)

Pre-stimulated mouse primary B cellsへのCyclophilin B miRNAの導入

Isolated B cells → Stimulation 1 day → Transfection → 2 days → RT-PCR(mRNA定量)

GenomONE-Si の取扱説明書プロトコル(1)で実施

【Cell】: Mouse primary B cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (8 weeks old)]
【Stimulation】: LPS (1μg/mL)
【Culture condition】: 1×10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 10mM HEPES, 50μM 2-ME
【Culture plate】: 24-well plate
【miRNA】: Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	miRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(10μM)	siRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

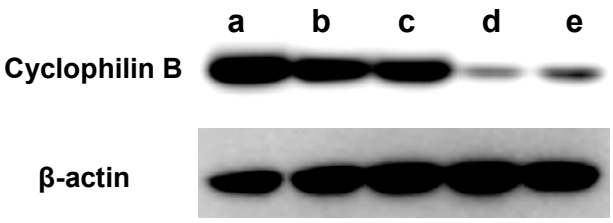
GenomONE-Siを用いてLPS刺激したmouse primary B cellsにMimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB) miRNAを導入したところ、82%のノックダウン効果が得られた。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず***GenomONE-Si***の優位性が示された。LPSはトランスフェクションの前後も入れたままで行った。

Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の１種で、そのノックダウン効果をReal-Time PCR法で定量的に評価。

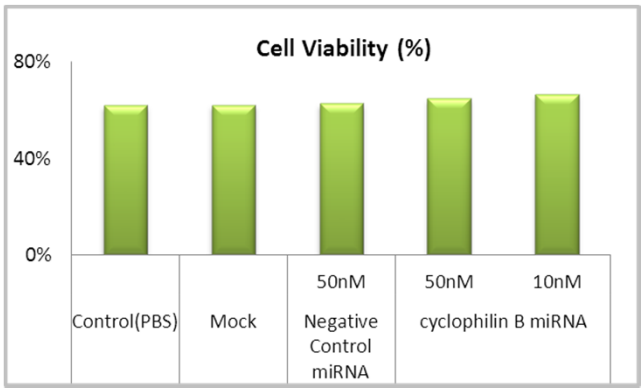
ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

BALB/c mouse primary B cells

miRNA transfection



a: Control (PBS)
b: Mock
c: Negative control miRNA (50nM)
d: Cyclophilin B miRNA (50nM)
e: Cyclophilin B miRNA (10nM)



Cell Viability (%); PI staining assay

Pre-stimulated mouse primary B cellsへのCyclophilin B miRNAの導入

Isolated B cells → (Stimulation, 1 day) → Transfection → (2 days) → Western blotting

***GenomONE-Si* の取扱説明書プロトコル（1）で実施**

【Cell】: Mouse primary B cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (11 weeks old)]
【Stimulation】: LPS (1μg/mL)
【Culture condition】: 1×10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 10mM HEPES, 50μM 2-ME
【Culture plate】: 24-well plate
【miRNA】: Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)（Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量（24-well plate）
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合（タッピング）	試薬D: 0.5μL
③	miRNA溶液を添加・混合（タッピング）　（10~2μM）	siRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合（タッピング）	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

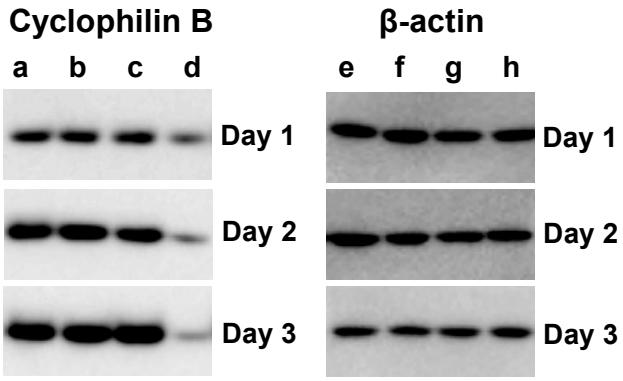
***GenomONE-Si*を用いてLPSで刺激したmouse primary B cellsにMimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB) miRNA(10, 50nM)を導入したところ、Western blotting法でノックダウン効果が確認された。LPSはトランスフェクションの前後も入れたままで行った。**

Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の１種で、そのノックダウン効果をWestern blotting法で評価。

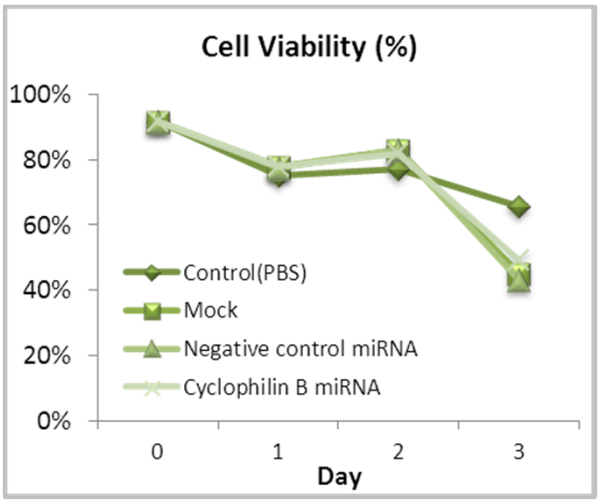
ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

BALB/c mouse primary B cells

miRNA transfection



a, e: Control(PBS)
b, f: Mock
c, g: Negative control miRNA(50nM)
d, h: Cyclophilin B miRNA(50nM)



Cell Viability (%); PI staining assay

Mouse primary B cellへのCyclophilin B miRNAの導入(Post- stimulation)

B cells isolation & Transfection → Stimulation 1～3 days → Western blotting

GenomONE-Si の取扱説明書プロトコル(1)で実施

【Cell】: Mouse primary B cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (12 weeks old)]
【Stimulation】: LPS (1μg/mL)
【Culture condition】: 1×10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 10mM HEPES, 50μM 2-ME
【Culture plate】: 24-well plate
【miRNA】: Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	miRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(10μM)	siRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

GenomONE-Siを用いて未刺激のmouse primary B cellsにMimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB) miRNAを導入し、LPSで1～3日間刺激した後に、Western blotting法でノックダウン効果が確認された。

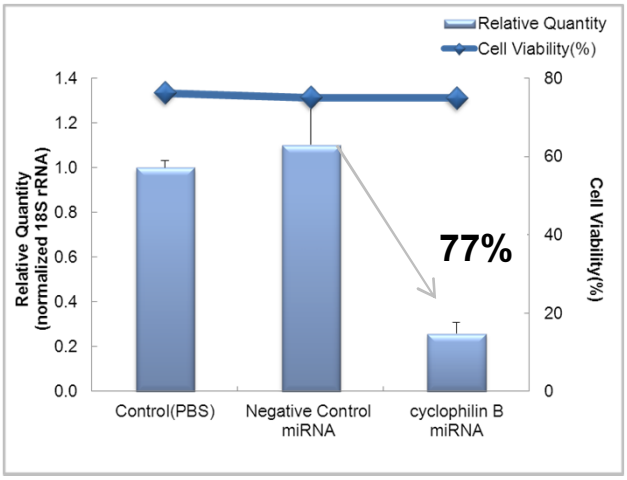
Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の1種で、そのノックダウン効果をWestern blotting法で評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

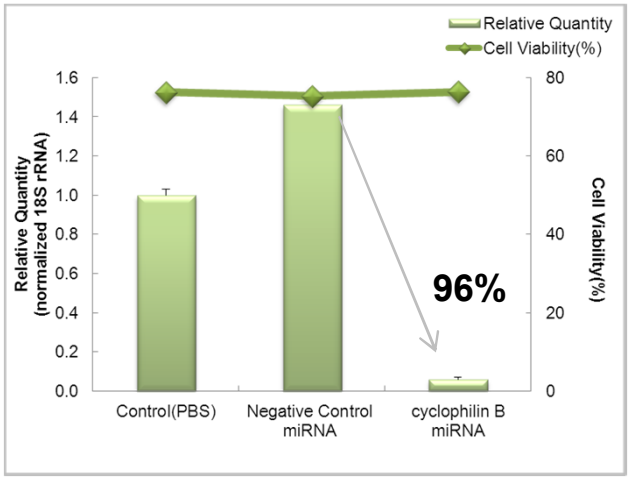
BALB/c mouse primary T cells

siRNA/miRNA transfection

siRNA transfection



miRNA transfection



Relative Quantity; qRT-PCR assays (n=2~3)
Cell Viability (%); PI staining assay

Pre-stimulated mouse primary T cellsへのCyclophilin B siRNA /miRNAの導入

Splenocyte → (Stimulation 1day) → T cells isolation & Transfection → (No-stimulation 2days) → RT-PCR(mRNA定量)

GenomONE-Si の取扱説明書プロトコル(1)で実施

【Cell】: Mouse primary T cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (7 weeks old)]
【Stimulation】: PMA(5nM) / ionomycin(1μg/mL)
【Culture condition】: 1 × 10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 1% GlutaMAX™(100×)
【Culture plate】:24-well plate
【siRNA】:siGENOME Cyclophilin B control siRNA (Thermo Scientific Cat No.D-001136-01-05)
Negative control #1 siRNA(Ambion Code No.AM4639)
【miRNA】:Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	siRNA/miRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(30μM)	siRNA/miRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

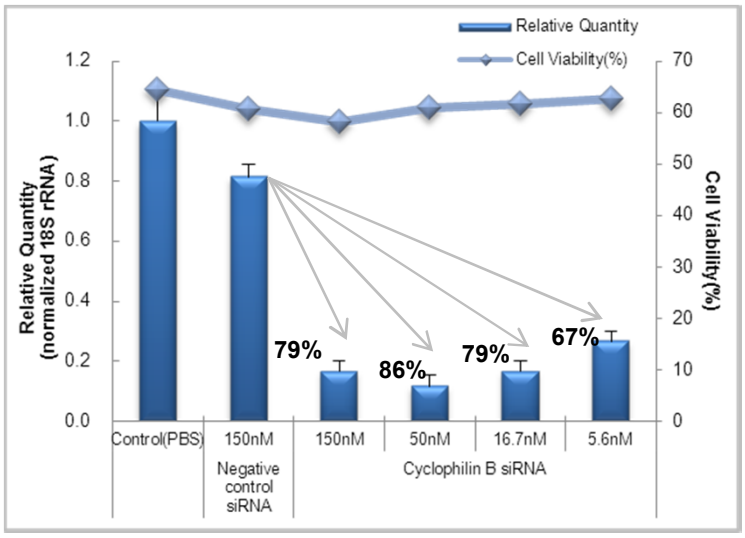
Mouse spleen cellsにPMA/ionomycinで1日間刺激後、T cellsを分離し、GenomONE-Siを用いてCyclophilin B control siRNAを導入したところ、77%のノックダウン効果が得られた。さらにMimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB) miRNAを導入したところ、96%のノックダウン効果が得られた。

Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の1種で、そのノックダウン効果をReal-Time PCR法で定量的に評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

BALB/c mouse primary T cells

siRNA transfection



Relative Quantity; qRT-PCR assays (n=3)
Cell Viability (%); PI staining assay

Pre-stimulated mouse primary T cellsへのCyclophilin B miRNAの導入

Splenocyte → Stimulation 1 day → T cells isolation & Transfection → No-stimulation 2 days → RT-PCR(mRNA定量)

GenomONE-Si の取扱説明書プロトコル(1)で実施

【Cell】: Mouse primary T cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (12 weeks old)]
【Stimulation】: PMA(5nM) / ionomycin(1μg/mL)
【Culture condition】: 8×10^5 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 1% GlutaMAX™(100×)
【Culture plate】: 24-well plate
【siRNA】: siGENOME Cyclophilin B control siRNA (Thermo Scientific Cat No.D-001136-01-05)
Negative control #1 siRNA(Ambion Code No.AM4639)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	siRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(30~1.1μM)	siRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

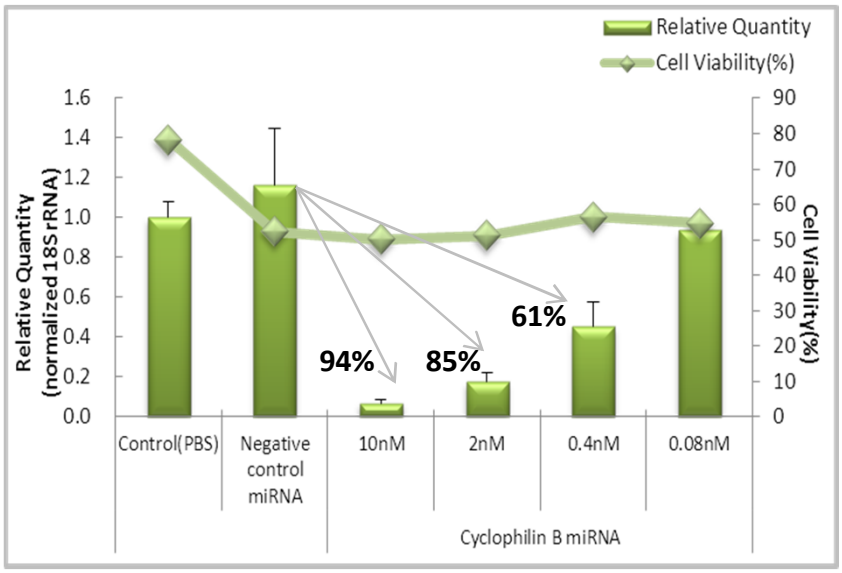
Mouse spleen cellsにPMA/ionomycinで1日間刺激後、T cellsを分離し、*GenomONE-Si*を用いてCyclophilin B control siRNAを導入後、RT-PCR法で70%以上のノックダウン効果が得られた。50nMのsiRNAを導入した時に、最大で86%のノックダウン効果が得られた。

Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の1種で、そのノックダウン効果をReal-Time PCR法で定量的に評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

C57BL/6 mouse primary T cells

miRNA transfection



Relative Quantity; qRT-PCR assays (n=3)
Cell Viability (%); PI staining assay

Pre-stimulated mouse primary T cellsへのCyclophilin B miRNAの導入

Splenocyte → **Stimulation** **1 day** → T cells isolation & Transfection → **No-stimulation** **2 days** → RT-PCR(mRNA定量)

GenomONE-Si **の取扱説明書プロトコル(1)で実施**

【Cell】: Mouse primary T cells [isolated from spleen of female C57BL/6 mouse (6 weeks old)]
【Stimulation】: PMA(5nM) / ionomycin(1μg/mL)
【Culture condition】: 1×10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 1% GlutaMAX™(100×)
【Culture plate】: 24-well plate
【miRNA】: Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	miRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(2~0.016μM)	miRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①~④の操作は、氷上で実施。

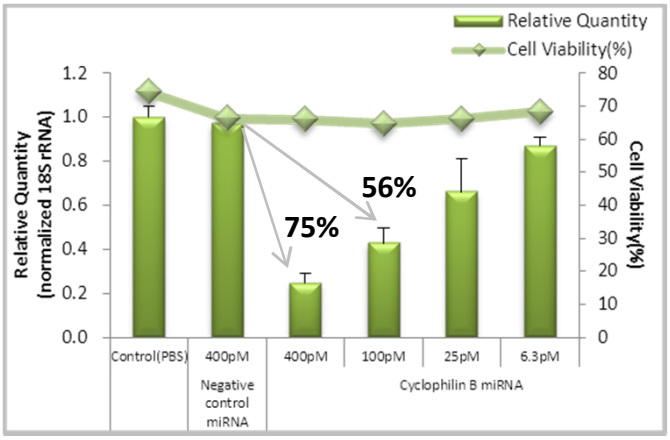
Mouse spleen cellsにPMA/ionomycinで1日間刺激後、T cellsを分離し、***GenomONE-Si***を用いて10nM Cyclophilin B control miRNAを導入したところ、RT-PCR法で最大94%のノックダウン効果が得られた。

Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の1種で、そのノックダウン効果をReal-Time PCR法で定量的に評価。

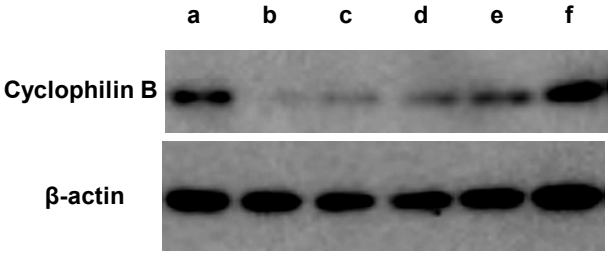
ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

BALB/c mouse primary T cells

miRNA transfection



Relative Quantity; qRT-PCR assays (n=3)
Cell Viability (%); PI staining assay



a; Negative control miRNA (1000pM)
b; Cyclophilin B miRNA (1000pM)
c; Cyclophilin B miRNA (400pM)
d; Cyclophilin B miRNA (100pM)
e; Cyclophilin B miRNA (25pM)
f; Cyclophilin B miRNA (6.3pM)

Pre-stimulated mouse primary T cellsへのCyclophilin B miRNAの導入

Splenocyte → Stimulation 1 day → T cells isolation & Transfection → No-stimulation 2 days → RT-PCR(mRNA定量) Western blotting

GenomONE-Si の取扱説明書プロトコル(1)で実施

【Cell】: Mouse primary T cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (6 weeks old)]
【Stimulation】: PMA(5nM) / ionomycin(1μg/mL)
【Culture condition】: 2×10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 1% GlutaMAX™(100×)
【Culture plate】: 24-well plate
【miRNA】: Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	miRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(200~0.3nM)	miRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

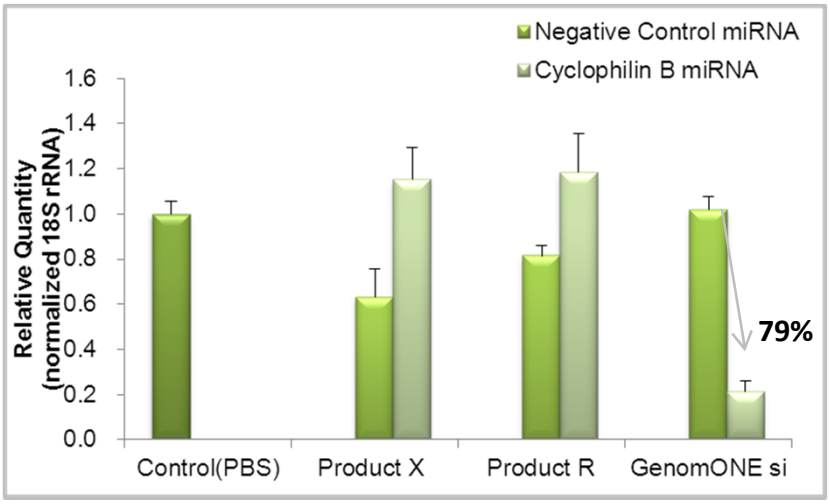
Mouse spleen cellsに PMA/ionomycinで1日間刺激後、T cellsを分離し、*GenomONE-Si*を用いてCyclophilin B control miRNA(400pM)を導入後、RT-PCR法で75%のノックダウン効果が得られた。さらにWestern blotting法でもノックダウン効果が確認された。

Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の1種で、そのノックダウン効果をReal-Time PCR法で定量的に評価。さらにWestern blotting法でも評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

BALB/c mouse primary T cells

miRNA transfection



Relative Quantity; qRT-PCR assays (n=3)

Pre-stimulated mouse primary T cellsへのCyclophilin B miRNAの導入

Splenocyte → Stimulation 1 day → T cells isolation & Transfection → No-stimulation 2 days → RT-PCR(mRNA定量)

GenomONE-Si の取扱説明書プロトコル(1)で実施

【Cell】: Mouse primary T cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (9 weeks old)]
【Stimulation】: PMA(5nM) / ionomycin(1μg/mL)
【Culture condition】: 1×10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 1% GlutaMAX™(100×)
【Culture plate】:24-well plate
【miRNA】:Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	miRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(2μM)	miRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

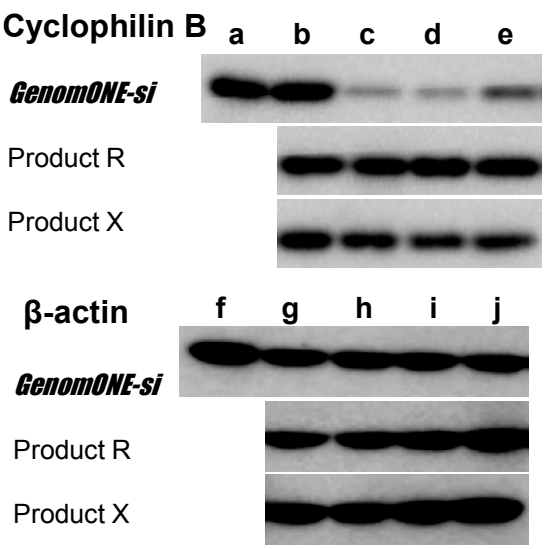
Mouse spleen cellsに PMA/ionomycinで1日間刺激後、T cellsを分離し、***GenomONE-Si***を用いてCyclophilin B control miRNAを導入したところRT-PCR法で79%のノックダウン効果が得られた。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず、***GenomONE-Si***の優位性が示された。

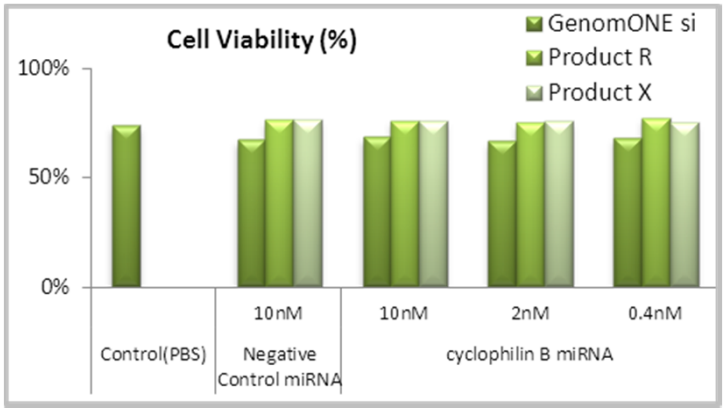
Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の1種で、そのノックダウン効果をReal-Time PCR法で定量的に評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

BALB/c mouse primary T cells

miRNA transfection





a, f: Control(PBS)
b, g: Negative control miRNA(50nM)
c, h: Cyclophilin B miRNA(50nM)
d, i: Cyclophilin B miRNA(2nM)
e, j: Cyclophilin B miRNA(0.4nM)

Cell Viability (%); PI staining assay

Pre-stimulated mouse primary T cellsへのCyclophilin B miRNAの導入

Splenocyte → (Stimulation, 1 day) → T cells isolation & Transfection → (No-stimulation, 2 days) → Western blotting

GenomONE-Si の取扱説明書プロトコル(1)で実施

【Cell】: Mouse primary T cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (8 weeks old)]
【Stimulation】: PMA(5nM) / ionomycin(1μg/mL)
【Culture condition】: 1×10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 1% GlutaMAX™(100×)
【Culture plate】: 24-well plate
【miRNA】: Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量 (24-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E: 2.5μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5μL
③	miRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(2~0.08μM)	miRNA: 10μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、48時間培養	HVJ-E懸濁液: 4.5μL/well

①～④の操作は、氷上で実施。

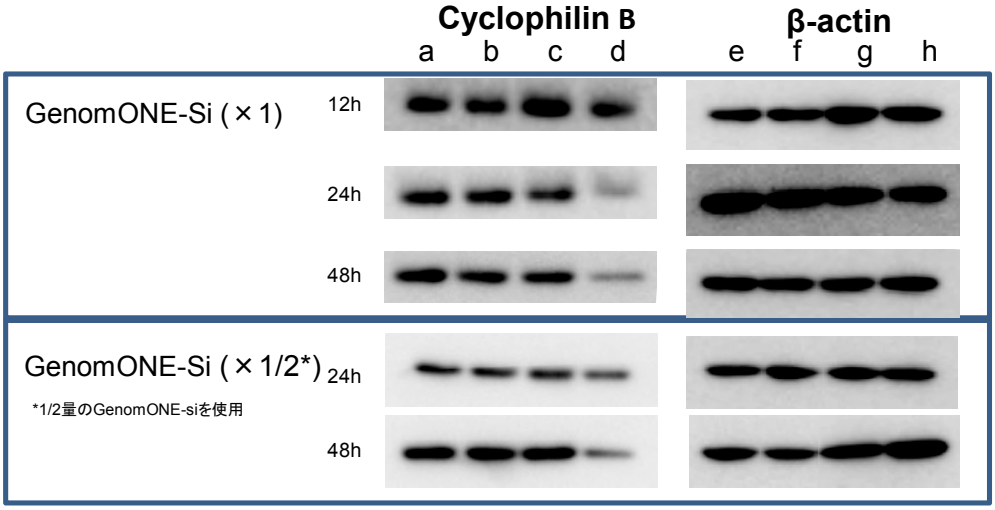
Mouse spleen cellsにPMA/ionomycinで1日間刺激後、T cellsを分離し、***GenomONE-Si***を用いてMimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(2, 50nM)を導入したところ、Western blotting法でノックダウン効果が確認された。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず、***GenomONE-Si***の優位性が示された。

Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の1種で、そのノックダウン効果をWestern blotting法で評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

BALB/c mouse primary T cells

miRNA transfection



a, e: Control(PBS)　b, f: Mock　c, g: Negative control miRNA(50nM)　d, h: Cyclophilin B miRNA(50nM)

Mouse primary T cellsへのCyclophilin B miRNAの導入(Post-stimulation)

T cells isolation & Transfection → Stimulation 12～48 h → Western blotting

***GenomONE-Si* の取扱説明書プロトコル(1)で実施**

【Cell】: Mouse primary T cells [isolated from spleen of female BALB/c mouse (12 weeks old)]
【Stimulation】: PMA(5nM) / ionomycin(1μg/mL)
【Culture condition】: 1×10^6 cells/well/500μL, RPMI-1640 with 10% FBS, 1% GlutaMAX™(100×)
【Culture plate】: 24-well plate
【miRNA】: Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)(Thermo Scientific Cat No.CP-002000-01-05)
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1(Thermo Scientific Cat No.CN-001000-01-05)

Step	手　順	試薬量（24-well plate）	
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	(×1):2.5μL	(×1/2):1.25μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	0.5μL	0.25μL
②'	緩衝液を添加・混合(タッピング)	ー	1.5μL
③	miRNA溶液を添加・混合(タッピング)　(10μM)	10μL	
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	5μL	5μL(×1/2希釈液)
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液をwell 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理、培養	HVJ-E懸濁液:　4.5μL/well	

①～④の操作は、氷上で実施。

***GenomONE-Si*を用いて未刺激のmouse primary T cellsにMimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB) miRNAを導入し、PMA/ ionomycinで24～48時間刺激した後に、Western blotting法によりノックダウン効果が確認された。**

Cyclophilin B(PPIB:peptidylprolyl isomerase B)は、ハウスキーピング遺伝子の1種で、そのノックダウン効果をWestern blotting法で評価。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816　FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

Memo

石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

Memo

石原産業株式会社
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e